Versuche zur Reduktion der 3-Phosphoglycerinsäure im Rahmen der Gluconeogenese

Ursula Bonengel

1972

Aus dem Institut für Tierphysiologie der Universität München

Vorstand: Professor DDr. DDr.h.c. Johannes BRÜGGEMANN

VERSUCHE ZUR REDUKTION DER 3-PHOSPHOGLYCERINSÄURE IM RAHMEN DER GLUCONEOGENESE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Ursula B o n e n g e l
aus Landshut

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. J. Boessneck
Referent: Professor Dr. Dr. Dr.h.c. Dr.h.c. Johs. Brüggemann
Korreferent: Univ.-Doz. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 14. Juli 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

U N I - Druck, M ü n c h e n 40, Amalienstraße 85

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. EINLEITUNG UND SCHRIFTTUM	1
II. MATERIAL UND METHODIK	7
1. Verwendete Präparate	7
2. Tiermaterial	7
3. Herstellung der Fraktionen "Weiß" und "Gelb" aus Lebermitochondrien	8
4. Bestimmung der DOAP-Bildung	9
5. Ammoniumsulfatfraktionierung des Plasmas	11
6. Chromatographie an DEAE-Cellulose	13
7. Weitere Reinigung durch Adsorption an Aluminiumgel	14
III. ERGEBNISSE	17
1. DOAP-Bildung mit der Fraktion "Gelb" und mit Plasma	17
2. Ergebnisse der Ammoniumsulfatfraktionierung	17
3. Chromatographie der "30 - 60 %-Fraktion" an DEAE-Cellulose	21
IV. DISKUSSION	30
V. ZUSAMMENFASSUNG	32
VI. LITERATURVERZEICHNIS	34

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

ADP = Adenosindiphosphat

ATP = Adenosintriphosphat

CoA = Coenzym A

DEAE-Cellulose = Diäthylaminoäthyl-Cellulose

DOAP = Dihydroxyacetonphosphat

GAPDH = Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase

GDH = Glycerin-3-phosphatdehydrogenase

GDP = Guanosindiphosphat

GTP = Guanosintriphosphat

G-1-P = Glucose-1-phosphat

G-6-P = Glucose-6-phosphat

$NAD^{\oplus}$ = Nikotinamidadenindinukleotid

$NADH + H^{\oplus}$ = Nikotinamidadenindinukleotid, hydriert

Pa = anorganisches Phosphat

PEP = Phosphoenolpyruvat

3-PG = 3-Phosphoglycerat

3-PGA = 3-Phospho-D-glycerinaldehyd

RZ = Rohrzucker

UDP = Uridindiphosphat

UTP = Uridintriphosphat

Upm = Umdrehungen pro Minute

I. EINLEITUNG UND SCHRIFTTUM

Nach der derzeitigen Lehrmeinung unterscheidet sich die Gluconeogenese von den im Rahmen der Glykolyse ablaufenden Umsetzungen in vier Reaktionsschritten:

1. Die energetisch außerordentlich ungünstig liegende Pyruvat-Kinase-Reaktion (direkte Phosphorylierung des Pyruvats zu Phosphoenolpyruvat) wird durch die decarboxylierende Phosphorylierung des Oxalacetats zu Phosphoenolpyruvat (PEP) umgangen (PEP-Carboxykinase-Reaktion):

   a) $\text{Pyruvat} + CO_2 + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{++}} \text{Oxalacetat} + \text{ADP} + \text{Pa}$

   b) $\text{Oxalacetat} + \text{GTP} \xrightarrow[-CO_2]{Mg^{++}} \text{Phosphoenolpyruvat} + \text{GDP}$

2. Die entstehenden Hexosephosphate werden bei der Glucosebildung durch Phosphatasen (Fructose-1,6-diphosphatase und Glucose-6-phosphatase) dephosphoryliert, unter Verlust der energiereichen Phosphatbindungen.

3. Die Glykogensynthese wird durch zusätzliche Aktivierung des durch Isomerisierung von Glucose-6-phosphat (G-6-P) entstandenen Glucose-1-phosphats (G-1-P) mit Hilfe von Uridintriphosphat (UTP) ermöglicht. Durch die Bindung an UDP wird die Glucose

so aktiviert, daß sie an die Glykogenkette angehängt werden kann:

a) UTP + G-1-P ⟶ UDP-Glucose + Pyrophosphat

b) UDP-Glucose + Glykogen ⟶ Glykogen-Glucose + UDP

Außerdem ist die Möglichkeit in Erwägung gezogen worden, daß die Reduktion des 3-Phospho-D-glycerats (3-PG) auf dem Rückweg zur Glucose durch ein besonderes, von der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) unabhängiges Enzymsystem katalysiert wird (1). Die GAPDH-Rückreaktion liegt in der Tat energetisch noch ungünstiger als die direkte Phosphorylierung des Pyruvats durch die Pyruvatkinase. Trotzdem tendiert die derzeitige Ansicht dahin, daß der durch die PEP-Carboxykinase erzeugte Substratdruck (= PEP-Synthese) zusammen mit der einen Sog in Richtung Glucose erzeugenden Hexosephosphatase-Wirkung ausreicht, um die Synthese ablaufen zu lassen.

Die Möglichkeit einer derartigen, bisher noch undurchsichtigen Reaktionsfolge ist aber nach Versuchen von LAMPRECHT und KATZELMEYER (2) gegeben, die nachweisen konnten, daß Rattenlebermitochondrien aus noch unbekannten Vorstufen Dihydroxyacetonphosphat (DOAP) bilden. Auch Versuche von WILKE (3) sprechen für das Vorhandensein eines besonderen Enzymsystems zur 3-PG-Reduktion.

WILKE ging von dem Gedanken aus, daß bei Vorhandensein einer "3-PG-Reduktase" im Rahmen der Gluconeogenese aus radioaktiven Vorstufen der Glucose (Glycerin, Glycerinsäure, Milchsäure etc.) eine asymmetrisch markierte Glucose auftreten müßte, und zwar müßten die C-Atome 1 - 3 stärker markiert sein, wenn Glycerin-C^{14} angeboten wird. Andererseits wäre eine höhere Radioaktivität in den C-Atomen 4 - 6 zu erwarten, wenn die Gluconeogenese aus Glycerinsäure oder Lactat gespeist wird. Schon in älteren Versuchen hatten SCHAMBYE u. M. (4) bei Hungerratten (Nahrungsentzug über 48 Stunden) festgestellt, daß nach Verabreichung von Glycerin-C^{14} eine asymmetrisch markierte Glucose entsteht, und diesen Effekt durch eine zu langsame bzw. überhaupt unvollständige Einstellung des Triosephosphatisomerase-Gleichgewichtes erklärt. Bei diesen Überlegungen wurde allerdings übersehen, daß die angebotenen hohen Glycerinmengen, die ja zumindest teilweise schnell in Glycerin-3-Phosphat und durch Dehydrierung in DOAP übergehen, das GAPDH-Gleichgewicht, das nur durch den Phosphatasesog (sh.o.) zugunsten der Glycerinaldehydphosphat-Bildung verschoben werden kann, zugunsten der 3-PG-Bildung - also der Glykolyse - ändern müssen. Nur durch ein besonderes, die Rückreaktion katalysierendes, von Gleichgewichtsbedingungen unabhängiges und durch den Hungerzustand stimuliertes bzw. induziertes Enzymsystem kann unter diesen Bedingungen eine Bildung von unmarkiertem Glycerinaldehydphosphat (3-PGA) und damit die Synthese einer asymmetrisch markierten Glucose ermöglicht werden. Von diesen Überlegungen ausgehend analysierte WILKE im Rattenversuch die C^{14}-Verteilung in der aus verschiedenen Vorstufen durch Gluconeo-

genese gebildeten Glucose. Die Glucose wurde als Osazon kristallisiert und die C-Atome 1 - 3 durch Abbau des Osazons zum 1,2-Biphenylhydrazon des Mesoxalaldehyds ebenfalls in kristallisierter Form erhalten. Mit Hilfe der Differenzmethode konnte die Radioaktivitätsverteilung zwischen den C-Atomen 1 - 3 und 4 - 6 ermittelt werden. Alle Ergebnisse entsprechen der Erwartung. Wurden die sich vor der 3-PG-Reduktion anordnenden Metaboliten der Gluconeogenese an Hungerratten verabreicht, so waren die C-Atome 4 - 6 stärker markiert, wurde Glycerin-C^{14} angeboten, so war die Radioaktivität in den C-Atomen 1 - 3 erhöht.

Andererseits ließ sich die Asymmetrie durch Hemmstoffe der Gluconeogenese (Insulin, Tryptophan (5)) aufheben, wenn Glycerin-C^{14} verwendet wurde. Dieses Ergebnis bestätigt ebenfalls die Arbeitshypothese, von der WILKE ausging: Nimmt man nämlich an, daß durch die erwähnten Inhibitoren die 3-PG-Reduktion gehemmt wird, so könnte aus Glycerin-C^{14} eine zwar hoch, aber symmetrisch markierte Glucose entstehen, während aus Lactat-C^{14} eine gering, aber unsymmetrisch markierte Glucose entstehen müßte. Das konnte von WILKE bestätigt werden. Demnach liefern diese Ergebnisse erste entscheidende Hinweise für das Vorhandensein eines speziellen Gluconeogenese-Enzyms, das die Rückreaktion vom 3-PG zum 3-PGA katalysiert.

Von SCHOLE und Mitarbeitern konnten weitere Hinweise für das Vorhandensein eines derartigen Gluconeogenese-Enzyms gewonnen werden (1). Diesen Autoren gelang es, die auch von LAMPRECHT und KATZELMEYER verwendeten Rattenlebermitochondrien durch Gelchro-

matographie an Sepharose 2 B in zwei Fraktionen, eine offensichtlich strukturierte "Weiße" und eine lösliche "Gelbe" Fraktion, zu trennen, die nur gemeinsam zur DOAP-Bildung in der Lage sind. Getrennt untersucht erwiesen sich diese Fraktionen als inaktiv. Außerdem konnte gezeigt werden, daß nach Gelfiltration an Sephadex (G 50, superfine) NAD^+ zur DOAP-Bildung erforderlich ist und daß Coenzym A (CoA) die Reaktionsfolge etwa in dem Umfang inhibiert, wie es von der Fettsäurensynthetase bekannt ist (6). Diese Hemmung konnte durch S-3-Phosphoglyceryl-N-Acetylcysteamin aufgehoben werden (1), was zu der Vermutung geführt hat, daß die CoA-Hemmung - wie bei der Fettsäurensynthese - durch Rückübertragung des Substrates (3-PG ?) auf das Coenzym A zu erklären ist. Allerdings ist es bisher nicht gelungen, 3-PG vom Enzym abzulösen und eine Wiederbeladung mit 3-PG-Cysteamin zu erzielen, so daß es als bisher noch ungeklärt anzusehen ist, in welcher Form das Substrat an das Enzymprotein gebunden ist. Daß die Bindung kovalent sein muß, ergibt sich aus der Tatsache, daß nach Sephadex-Passage keine wesentliche Verminderung der DOAP-Bildung zu beobachten ist. Diese bisherigen Ergebnisse haben zu der vorläufigen Arbeitshypothese geführt, daß 3-PG oder ein Umwandlungsprodukt desselben in Thioesterbindung an der Fraktion "Weiß" fixiert ist, und zwar an einer SH-Gruppe der Thioctansäure, und daß mit Hilfe der Fraktion "Gelb" die Carboxylgruppe des 3-PG zur Aldehydgruppe reduziert wird, unter Oxydation der Thioctansäure zum Disulfid. Der entstehende 3-PGA könnte dann durch eine in der Fraktion "Gelb" enthaltene Triosephosphatisomerase zum DOAP isomerisiert werden. Es würde sich nach diesen, noch hypo-

thetischen Vorstellungen um eine rückläufige oxydative Decarboxylierung handeln, nur daß die abschließende "Carboxylierung" entfallen kann. Bei der oxydativen Decarboxylierung werden bekanntlich α-Ketosäuren zu den entsprechenden Aldehyden decarboxyliert, die durch Reaktion mit dem Thioctansäuredisulfid zur Carbonsäure oxydiert und anschließend von der Dihydrothioctansäure auf Coenzym A übertragen werden.

Neben den Bemühungen um die Charakterisierung des an der Reaktion beteiligten Substrates ist im Rahmen dieser Arbeiten auch versucht worden, die Fraktion "Gelb" weiter zu reinigen, um in Erfahrung zu bringen, ob nur ein Enzym oder ob mehrere lösliche Enzyme an der DOAP-Bildung beteiligt sind. Der Erfolg ist bisher ausgeblieben. Daher wurde mir die Aufgabe gestellt zu versuchen, diese Fraktion mit Hilfe verschiedener chromatographischer Verfahren weiter aufzutrennen.

II. MATERIAL UND METHODIK

1. Verwendete Präparate:

Alle Enzyme und Biochemikalien wurden von der Firma BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, Mannheim, bezogen. Alle Sephadex- und Sepharose-Präparate stammen von der Firma DEUTSCHE PHARMACIA GMBH, Frankfurt. DEAE-Cellulose erhielten wir von der Firma SERVA, Heidelberg.

2. Tiermaterial:

Zur Bereitung der Fermentpräparate (Fraktionen "Weiß" und "Gelb"; s. u.) wurden Lebern von WISTAR-Ratten verwendet. Die Tiere waren als SPF-Ratten von dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover-Linden, angekauft und vor der Verwendung 4 Wochen mit einer Spezialdiät ("Zuchtfutter grün") folgender Zusammensetzung gefüttert worden:

Weizenschrot	45 %
Maisschrot	33 %
Sojaschrot	15 %
Magermilchpulver	3 %
Luzernegrünmehl	2 %
Mineralstoffmischung*)	2 %

*) 40 % Kohlensaurer Futterkalk,
30 % Phosphorsaurer Futterkalk,
24,5 % Viehsalz,
5 % Magnesiumphosphat,
0,5 % Spurenelemente (als Sulfate) (Fe:Cu:Mn:Co = 5:1,5:1:2)

3. Herstellung der Fraktionen "Weiß" und "Gelb" aus Lebermitochondrien:

Zunächst war es erforderlich, die Fraktion "Gelb" zu präparieren, da diese Ausgangsprodukt für weitere Untersuchungen sein sollte. Es wurde aber auch die Fraktion "Weiß" benötigt, um die aus der Fraktion "Gelb" gewonnenen Unterfraktionen testen zu können. "Gelb" und "Weiß" wurden folgendermaßen hergestellt:
4 - 5 Lebern von Ratten, denen 24 Stunden vor dem Töten das Futter entzogen worden war, wurden unter Eiskühlung grob zerkleinert und anschließend mit einem POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator in Rohrzucker (RZ)-Trispuffer (17 g Rohrzucker + 30 ml Trispuffer (0,05 M, pH 7,6) + H_2O ad 200 ml) homogenisiert. Zur Abtrennung der groben Bestandteile und der Zellkerne wurde 3 Min. bei 3.000 Upm, der erhaltene Überstand in einer Kühlzentrifuge 10 Min. bei 10.000 Upm und der dadurch gewonnene Überstand 15 Min. bei 20.000 Upm zentrifugiert. Der jetzt abdekantierte Überstand wird im Folgenden als Plasma bezeichnet. Der Bodensatz wurde einmal mit Triäthanolamin - KCl- Puffer (Triäthanolamin 10^{-2} M, KCl 4,8 %, Titriplex III 10^{-3} M; pH 7,2) gewaschen und anschließend mit 10 - 15 ml derselben KCl-Pufferlösung aufgenommen. Die so erhaltene Mitochondriensuspension wurde nochmals im POTTER homogenisiert, dann mit Desoxycholatlösung versetzt (pro 10 ml der Suspension wurden 3 ml Desoxycholatlösung (10 mg/ml) zugegeben) und eine Stunde im Eisbad belassen. Jetzt konnte die Auftrennung an Sepharose 2 B vorgenommen werden. Es

wurde folgendermaßen verfahren:
Eine Säule (2 cm Ø, 20 cm hoch) wurde mit dem Gel gefüllt und zur Entfernung des Acids (NaN_3), das in handelsüblicher Sepharose zur Konservierung enthalten ist, mit 50 ml eines Trispuffers (0,005 M) vorgewaschen. Dann wurden 35 ml des Mitochondrienextraktes aufgegeben. Bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von ca. 0,5 ml/Min. wurden etwa 12 Fraktionen zu je 5 ml erhalten, von denen die ersten 4 trübe und nahezu farblos, die letzten 4 klar und rein gelb waren. Bei den trüben Proben handelte es sich um die Fraktion "Weiß", bei den rein gelben um die Fraktion "Gelb".

Aus dem Mitochondrienanteil, der sich bei 10.000 Upm (sh. o.) abgesetzt hat, läßt sich auch noch aktive Fraktion "Gelb" gewinnen. Schon hier sei erwähnt, daß in ersten Versuchen festgestellt werden konnte, daß auch im Plasma (sh. o.) die in der Fraktion "Gelb" enthaltenen, zur DOAP-Bildung erforderlichen Faktoren enthalten sind, und zwar in so hoher Aktivität, daß für die Anreicherung dieser Enzyme immer vom Plasma ausgegangen wurde (vgl. S. 17). Der bei 10.000 Upm abzentrifugierte Mitochondrienanteil wurde daher nicht mitverwendet.

4. Bestimmung der DOAP-Bildung:

Um die Aktivität der Fraktionen "Gelb" bzw. des Plasmas und der Unterfraktionen feststellen zu können, wurde der von

SCHOLE (1) angegebene DOAP-Test verwendet, der die Fraktion "Weiß" und außerdem NAD^+ erfordert. Folgender Ansatz wurde in ein Zentrifugenglas (10 ml) pipettiert:

0,40 ml Fraktion "Weiß",
0,06 ml NAD^+ (10 mg/ml),
0,10 ml Fraktion "Gelb" bzw. Plasma bzw. Unterfraktion,
0,94 ml Trispuffer (0,05 M, pH 7,6).
1,50 ml

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37^o C inkubiert, mit 3 ml $HClO_4$ (6 %ig; G/V) enteiweißt, der Proteinniederschlag abzentrifugiert und der Überstand mit K_2CO_3 (5 M) bei $+4^o$ C neutralisiert. Das ausgefallene Perchlorat wurde (nach Kühlung im Eisbad) abzentrifugiert und 4 ml der überstehenden Lösung zur DOAP-Bestimmung verwendet. Das DOAP wurde in Anlehnung an die Vorschrift von BÜCHER und Mitarbeitern (7) mit Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GDH) enzymatisch erfaßt:

$$\text{DOAP} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GDH}} \text{L-Glycerin-3-phosphat} + \text{NAD}^+$$

Folgender Ansatz wurde verwendet (366 nm; Schichttiefe 3 cm):

4,00 ml Trispuffer (0,05 M, pH 7,6),
0,05 ml NADH + H^+ (10 mg/ml),
4,00 ml Probelösung

Start: 0,05 ml GDH (1,5 mg/ml).

Für die Berechnung gilt allgemein, wenn - wie in diesem Falle - pro Mol Substrat ein Mol NADH + H^+ umgesetzt wird:

$$\frac{\Delta E \times V}{\epsilon \times d \times v} = \mu M \text{ Substrat/ml Probelösung.}$$

Dabei ist: $\Delta E = E_1 - E_2$

E_1 = Vor dem Start abgelesene Extinktion

E_2 = Am Ende der Reaktion abgelesene Extinktion, korrigiert um die Enzymverdünnung

ϵ = Extinktionskoeffizient für NADH + H^+ bei 366 nm ($3{,}3\ cm^2/\mu M$)

V = Testvolumen in ml

v = Probevolumen in ml

d = Schichttiefe in cm

Alle Ergebnisse wurden in μM DOAP gebildet pro g Protein/Stunde ausgedrückt.

5. <u>Ammoniumsulfatfraktionierung des Plasmas:</u>

Eine Vorfraktionierung des Plasmas wurde durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat erreicht. Das Plasma wurde im Kühlraum auf

4^{o} C gekühlt und dann unter Rühren langsam festes Ammoniumsulfat zugegeben. Nachdem die Menge erreicht war, die zu einer Sättigung von 40 % erforderlich ist*), wurde noch eine halbe Stunde weitergerührt und dann der gebildete Niederschlag abzentrifugiert (Fraktion 0 - 40 %). Der Überstand wurde bis zu einer Sättigung von 60 % weiter mit Ammoniumsulfat versetzt und zur vollständigen Fällung 30 Min. weitergerührt. Durch Zentrifugieren wurde die Fraktion "40 - 60 % Sättigung" erhalten. Der Überstand wurde noch bis zu einer Sättigung von 80 % gebracht, 30 Min. gerührt und ebenfalls zentrifugiert (Fraktion 60 - 80 % Sättigung). Alle Fraktionen wurden mit 10 - 15 ml eines verdünnten Phosphatpuffers (0,005 M, pH 7,0) aufgenommen und - da die Ammoniumionen den DOAP-Test stören (1) - an Sephadex entsalzt.

Hierzu wurde eine wässrige Suspension von Sephadex G 50 (Medium oder fine) zur Quellung eine Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt und nach dem Abkühlen in eine Säule gefüllt (Ø 2 cm; Höhe 24 cm). Die Säule wurde nach dem vollständigen Absetzen mit 10 ml des verdünnten Phosphatpuffers vorgewaschen und dann die in dem gleichen Phosphatpuffer gelöste Fraktion aufgegeben. Das Erscheinen des Proteins im Eluat konnte an der Trübung erkannt werden. Es wurden Fraktionen von etwa 5 ml aufgefangen und jeweils in 0,1 ml mit NESSLERS Reagens auf Ammoniumionen geprüft. Nur die Fraktionen, die keine Ammoniumionen mehr enthielten, wurden weiter verarbeitet.

---

*) 100 %ige Sättigung = 76,14 g Ammoniumsulfat/100 ml (4^{o}C)

6. Chromatographie an DEAE-Cellulose*):

Etwa 20 g des Cellulose-Ionenaustauschers (DEAE-SS, Kapazität 0,60) wurden in Zentrifugengläsern in 0,005 M Phosphatpuffer, pH 7,0, suspendiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Dieser Waschprozess wurde so lange wiederholt, bis im Überstand keine Cl^--Ionen mehr nachweisbar waren (Prüfung mit verdünnter Salpetersäure + $AgNO_3$-Lösung). Der Austauscher wurde dann - suspendiert in derselben Pufferlösung - in Säulen gefüllt (⌀ 2 cm; Füllhöhe 24 cm). Nach dem Absetzen wurden die Ammonium-freien Fraktionen des Plasmas (s. o.) auf die Säule aufgezogen und so lange mit dem verdünnten Phosphatpuffer (0,005 M) gewaschen bis kein Protein mehr im Eluat nachweisbar war (Messung bei 280 nm im ZEISS-Spektral-Photometer). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden als Fraktion 1 bezeichnet. Anschließend wurde mit steigenden $PO_4^{\equiv}$-Konzentrationen eluiert (0,02 M, 0,08 M, 0,2 M).

Die Fraktionsgröße betrug jeweils 8 ml. Mit jeder Phosphatkonzentration wurde so lange gewaschen, bis kein Protein im Eluat bei 280 nm mehr nachweisbar war. Die Fraktionen mit den höchsten Proteingehalten wurden jeweils vereinigt und die proteinarmen bzw. proteinfreien Proben verworfen.

---

*) DEAE-Cellulose = Diäthylaminoäthyl-Cellulose

Da die $PO_4^{'''}$-Ionen (vgl. S. 22) die weitere Reinigung (s. u.) und in hoher Konzentration auch den DOAP-Test stören, war eine zweite Entsalzung an Sephadex G 50 erforderlich. Dieser Arbeitsgang entsprach dem bei der Ammonsulfatfraktionierung beschriebenen Vorgehen. Phosphatfreiheit wurde mit Ammoniummolybdat + HNO_3 festgestellt. Nur die phosphatfreien Fraktionen wurden getestet und weiterverarbeitet.

7. Weitere Reinigung durch Adsorption an Aluminiumgel:

Da die Testung ergeben hatte, daß die Fraktionen 1 und 4 (= Elution mit 0,2 M $PO_4^{'''}$) die aktiven Prinzipien enthalten (vgl. S. 24), wurden diese Fraktionen durch Adsorption an Calcium- bzw. Aluminiumgel weiter gereinigt. Die Gele waren folgendermaßen gewonnen worden (8):

a) Aluminiumgel ($Al_2O_3 \cdot 3\ H_2O$):

Eine heiße Lösung von 170 g Aluminiumammoniumsulfat in 250 ml Wasser wurde auf einmal in 1,63 l einer auf 60° aufgeheizten Lösung von Ammoniumsulfat in verdünntem Ammoniak (100 g Ammoniumsulfat + 250 ml einer 20 %igen Lösung von Ammoniak) gegossen. Während der Präzipitation und weitere 15 Min. danach wurde kräftig gerührt und die Temperatur bei 60° C gehalten. Anschliessend wurde die Mischung auf 10 l verdünnt und die überstehende

Flüssigkeit nach dem Absetzen vorsichtig dekantiert. Der Niederschlag wurde noch viermal durch Suspendieren und Dekantieren gewaschen und dann zur Zerstörung von verbleibendem basischen Aluminiumsulfat mit 20 ml einer 20 %igen Ammoniaklösung versetzt. Dann wurde mit Wasser weiter gewaschen, bis nach 15 - 20 Waschungen die überstehende Flüssigkeit etwas trübe blieb. Die Waschungen wurden von diesem Zeitpunkt an noch mehrmals wiederholt, wobei - wegen des langsamen Absetzens des Geles - mehrere Tage erforderlich waren. Das so präparierte Gel konnte nach 3-monatiger Lagerung verwendet werden.

b) Calciumphosphat-Gel:

150 ml einer $CaCl_2$-Lösung (132 g $CaCl_2$/l) wurden ad 1.600 ml mit Leitungswasser verdünnt und mit 150 ml einer Trinatriumphosphatlösung (152 g $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$/l) versetzt. Diese Mischung wurde mit verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 7,0 gebracht, die Fällung viermal - wie oben beschrieben - mit 15 - 20 l Leitungswasser und abschließend in einer Zentrifuge mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Gel war so gebrauchsfertig.

Aus Vorversuchen ergab sich, daß die besten Ergebnisse sowohl bei der Fraktion 1 als auch bei der Fraktion 4 mit Aluminiumgel erhalten wurden, so daß die weitere Reinigung dieser Fraktionen

ausschließlich mit diesem Gel vorgenommen worden ist. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde in allen Fällen mit Hilfe der BIURET-Bestimmung und der Trockensubstanzgehalt des Geles durch Trocknung bei 100° C im Trockenschrank und Nachtrocknung über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz ermittelt. Das Gel wurde dann mit der Proteinlösung im Verhältnis 2 : 1 bzw. 3 : 1 bzw. 4 : 1 (Geltrockenmasse : Protein) gemischt und 10 Min. im Kühlraum (4° C) gerührt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand bei 280 nm gemessen. Der Überstand der dritten Probe (Verhältnis 4:1, s. o.) enthielt am wenigsten Protein.

Der hier adsorbierte Proteinanteil wurde mit steigenden Phosphatkonzentrationen (0,02 M, 0,08 M, 0,2 M) eluiert. In der Regel wurden 60 - 80 ml Fraktion nach Feststellung des Proteingehaltes an eine entsprechende Gelmenge adsorbiert. Zur Elution wurde das mit dem Protein beladene Gel in einem 50 ml fassenden Zentrifugenglas 10 Min. bei 4° C mit 10 ml-Portionen des jeweiligen Phosphatpuffers gerührt, zentrifugiert und im Überstand bei 280 nm der Proteingehalt ermittelt. Die Elution wurde so lange fortgesetzt, bis sich kein Protein mehr vom Gel ablösen ließ. Die Eluate wurden wiederum an Sephadex entsalzt (s. o.) und durch Gefriertrocknen konzentriert. Das so gewonnene Protein wurde in verdünntem Trispuffer (0,005 M, pH 7,6) gelöst und im DOAP-Test geprüft (vgl. S. 10).

III. E R G E B N I S S E

1. DOAP-Bildung mit der Fraktion "Gelb" und mit Plasma

Zunächst wurde geprüft, ob das Plasma (vgl. S. 8) ebenso wie die Fraktion "Gelb" in Gegenwart der Fraktion "Weiß" eine DOAP-Bildung induzieren kann. Der auf S. 10 beschriebene Ansatz wurde mit verschiedenen Anteilen der Fraktion "Gelb" bzw. mit verschiedenen Plasmaanteilen inkubiert. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde die DOAP-Bildung gemessen (Tabelle 1). Die mit verschiedenen Plasmaanteilen erhaltenen DOAP-Bildungsraten sind außerdem in der Abb. 1 dargestellt. Nach diesen Ergebnissen (Tabelle 1; Abb. 1) konnte es als sicher gelten, daß die zur DOAP-Bildung erforderlichen Faktoren auch in der Plasmafraktion, und zwar mit deutlich höherer Aktivität vorkommen. Es war daher sinnvoll, bei der Trennung bzw. Anreicherung dieser Faktoren vom Plasma auszugehen.

2. Ergebnisse der Ammoniumsulfatfraktionierung

Die zunächst durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat gewonnenen Plasma-Fraktionen wurden wie auf S. 12 beschrieben an Sephadex entsalzt und dann in den DOAP-Test eingesetzt. Die Ergebnisse

Tabelle 1: DOAP-Bildung mit der Fraktion "Gelb" bzw. mit Plasma (vgl. S. 10)

(Fraktion "Weiß" 8,9 mg Protein/Ansatz)

mg Protein Fraktion "Gelb"/ Ansatz	mg Plasma-Protein/Ansatz	/uMol DOAP/g Protein*)/ Stunde
1,14	-	14,5
3,8	-	11,9
-	1,06	250
-	2,12	104

*) Ohne Protein der Fraktion "Weiß"

sind in der Tabelle 2 zusammengestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß der Proteinanteil, der bei einem Sättigungsgrad von 40 - 60 % ausgesalzen worden ist, die höchste Aktivität aufweist. Diese Fraktion wurde daher an DEAE-Cellulose weiter gereinigt. Bei späteren Präparationen wurde die "30 - 60 %-Fraktion" verwendet, weil auch in der "0 - 40 %-Fraktion" noch Aktivität anzutreffen war (Tabelle 2).

Abb. 1: DOAP-Bildung mit der Fraktion "Weiß" + Plasmaprotein

(Ansatz vgl. S. 10)

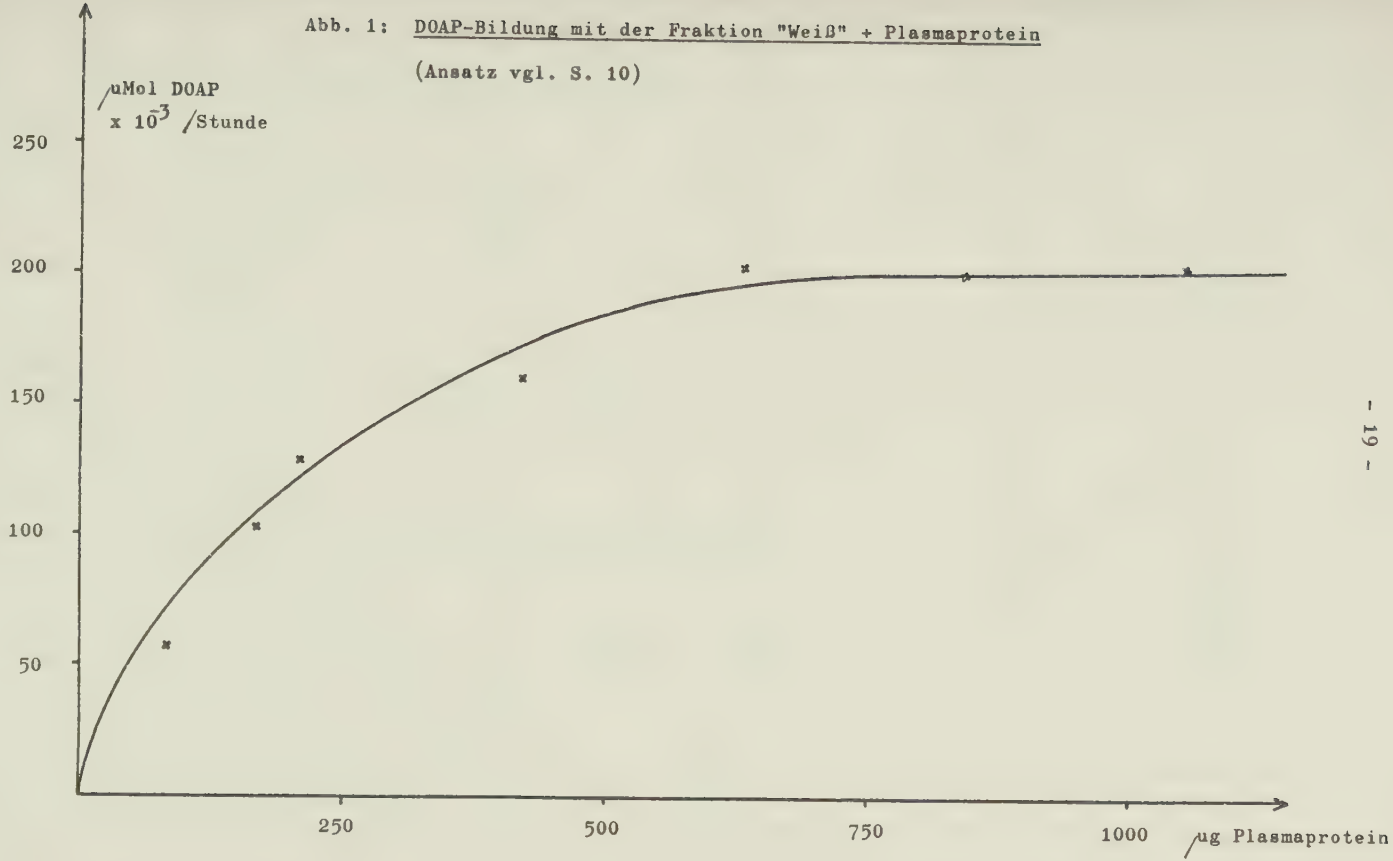

Tabelle 2: DOAP-Bildung mit den Plasmafraktionen der Ammoniumsulfatfällungen (vgl. S. 11)

(NH_4^+-frei; Fraktion "Weiß" 8,9 mg Protein/ml)

Sättigung mit $(NH_4)_2 SO_4$ %	mg Protein der Plasmafraktion/ Ansatz	/uMol DOAP/ Ansatz/ Stunde	/uMol DOAP/ g Protein*)/ Stunde
0 - 40	1,24	0,079	63,5
	0,62	0,115	185
	0,31	0,123	396
	0,155	0,082	530
40 - 60	3,20	0,057	17,9
	1,60	0,124	78,0
	0,80	0,156	195
	0,40	0,171	428
	0,20	0,171	856
	0,16	0,096	738
	0,08	0,059	603
60 - 80	0,66	-	69,1
	0,33	-	103

*) ohne Protein der Fraktion "Weiß"

Die Meßwerte der Tabelle 2 weisen außerdem darauf hin, daß im Cytoplasma ein Hemmfaktor enthalten sein muß, dessen Wirksamkeit mit steigender Proteinverdünnung abnimmt. Eventuell handelt es sich hier um ein Enzym, das - wenn es in ausreichender Konzentration anwesend ist - eine Abspaltung des Substrates bewirkt, entsprechend der für den Fettstoffwechsel bedeutsamen "Deacylase".

3. Chromatographie der "30 - 60 %-Fraktion" an DEAE-Cellulose

Da bei der Elution des an die DEAE-Cellulose gebundenen Proteins z. T. hohe PO_4^{III}-Konzentrationen erforderlich sind, wurde zunächst untersucht, in welchem Konzentrationsbereich PO_4^{III}-Ionen den DOAP-Test stören. Es wurde der in Frage kommende Bereich von $3{,}3 \times 10^{-4}$ M bis 4×10^{-2} M (entsprechend einem Zusatz von 0,1 ml 0,005 M PO_4^{III} bis 0,1 ml 0,2 M PO_4^{III}, pH 7,0, pro Ansatz) überprüft. Um pH-Verschiebungen zu vermeiden, die bei der pH-Empfindlichkeit der Reaktion (1) zu Fehlern führen konnten, wurden alle Ansätze mit einem pH-Meter genau auf einen pH-Wert von 7,6 gebracht. Das Ergebnis ist aus der Tabelle 3 zu entnehmen. Es stören demnach nur PO_4^{III}-Konzentrationen, die über 10^{-2} M liegen. In diesem Fall ist eine Entfernung der PO_4^{III}-Ionen mit Hilfe einer Sephadex-Passage erforderlich, wenn eine phosphathaltige Fraktion im DOAP-Test geprüft werden soll.

Tabelle 3: Beeinflussung der DOAP-Bildung durch $PO_4^{'''}$-Ionen

(0,4 ml Fraktion "Weiß" (9,4 mg Protein/ml)
+ 0,015 ml Plasma (vgl. S. 10))

ml M $PO_4^{'''}$/ Ansatz	M $PO_4^{'''}$ Endkonzentration	/uMol DOAP/g Protein*)/ Stunde	% Änderung
Kontrolle	ohne Zusatz	344	
0,1 ml 0,005 M	$3.33 \cdot 10^{-4}$ M	364	
0,1 ml 0,02 M	$1.33 \cdot 10^{-3}$ M	387	+ 13
0,1 ml 0,08 M	$5.33 \cdot 10^{-3}$ M	356	
0,1 ml 0,20 M	$1.33 \cdot 10^{-2}$ M	340	
0,2 ml 0,20 M	$2.67 \cdot 10^{-2}$ M	298	- 13,5
0,3 ml 0,20 M	$4 \cdot 10^{-2}$ M	246	- 28,5

*) Ohne Protein der Fraktion "Weiß"

Nach diesen Vorversuchen wurde der NH_4^+-freie Plasmaprotein-Anteil, der bei einer 30 - 60 %igen Sättigung mit Ammoniumsulfat ausgeflockt war, auf eine DEAE-Cellulose-Säule aufgezogen, fraktioniert eluiert und die einzelnen Fraktionen im DOAP-Test vermessen (Versuch A). Wie sich aus der Tabelle 4 (S. 24) entnehmen läßt, erwiesen sich alle Fraktionen als inaktiv. Daraufhin wurden die Fraktionen 2 - 4 mit der Fraktion 1 kombiniert. Speziell durch Kombination der Fraktion 1 mit der Fraktion 4 konnte eine DOAP-Bildung in der Höhe erzielt werden, wie sie auch mit dem Ausgangsprodukt (Plasmafällung bei einer Sättigung mit Ammoniumsulfat von 30 - 60 % (Tabelle 2)) etwa erreicht worden ist (Tabelle 4). Ein Wiederholungsversuch (Versuch B) führte prinzipiell zu demselben Ergebnis (Tabelle 5, S. 25). Auch hier erwies sich eine Kombination der Fraktionen 1 und 4 als aktiv. In diesem Versuch wurde auch ermittelt, daß durch Enteiweißung der Fraktion 1 und anschließendes Neutralisieren das aktive Prinzip zerstört wird. Es dürfte sich also - wie zu erwarten - um ein Protein handeln.

Abschließend wurde noch eine weitere Reinigung bzw. Anreicherung der in den Fraktionen 1 und 4 vorliegenden Komponenten in Angriff genommen. Durch Adsorption dieser Fraktionen an Aluminiumgel und fraktionierte Elution mit PO_4^{III}-Ionen unterschiedlicher Molarität (vgl. S. 14) konnte eine weitere An-

Tabelle 4: DOAP-Bildung mit den bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose gewonnenen Fraktionen (vgl. S. 10)*)

(Versuch A)

Fraktion eluiert mit M PO_4^{m}	mg Fraktions-Protein/Ansatz (ohne Fraktion "Weiß)	/µMol DOAP/g Protein Stunde**)/
0,005 (1)	0,076	87
0,02 (2)	0,124	u.d.B.***)
0,08 (3)	0,178	u.d.B.
0,20 (4)	0,085	88
(1) + (2)	0,200	22
(1) + (3)	0,254	421
(1) + (4)	0,161	678

*) Blindwert der Fraktion "Weiß" (= 11,1 mg Protein/ml) abgezogen

**) Ohne Protein der Fraktion "Weiß"

***) u.d.B. = Unter der Bestimmungsgrenze

Tabelle 5a: DOAP-Bildung mit den bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose gewonnenen Fraktionen (vgl. S. 10)*)

(Versuch B)

Fraktion eluiert mit M PO_4^{III}		mg Fraktions-Protein/ Ansatz (ohne Fraktion "Weiß")	/uMol DOAP/ g Protein**)/ Stunde
0,005	(1)	0,326	u.d.B.***)
0,02	(2)	-	u.d.B.
0,08	(3)	-	u.d.B.
0,20	(4)	0,132	50

Tabelle 5b: Kombinationen der Fraktionen (1) und (4)

Fraktionen	mg Protein der Fraktion (1)/Ansatz	mg Protein der Fraktion (4)/Ansatz	/uMol DOAP/Ansatz/Stunde	
			absolut	pro g Protein (Fraktionen (1) + (4))
(1) + (4)	0,326	0,132	0,191	395
(1) + (4)	0,652	0,132	0,195	236
(1) + (4)	0,978	0,132	0,190	160
(1) + (4)	0,326	0,264	0,204	340
(1) + (4)	0,326	0,396	0,204	290
(1) entei weißt und neutralisiert + (4)	-	0,132	u.d.B.	

*) Blindwert der Fraktion "Weiß" (15,3 mg Protein/ml) abgezogen

**) Ohne Protein der Fraktion "Weiß"

***) u.d.B. = unter der Bestimmungsgrenze

Tabelle 6: DOAP-Bildung mit den Unterfraktionen der Fraktion (4) nach Adsorptionschromatographie an Aluminiumgel (vgl. S. 10)*)

(Eluat + 0,1 ml Fraktion (1); 0,1 ml Fraktion (1) (ohne Eluat): DOAP-Bildung u.d.B.**))

Elution mit M PO_4^{m}	Eluat-Nr. (je 10 ml)	mg Protein der Unterfraktion (Eluat)/Ansatz	/µMol DOAP/ g Protein der Unterfraktion***)/ Stunde
0,005	1	-	-
0,02	1	-	-
	2	-	-
0,08	1	0,076	2860
	2	0,060	3560
	3	0,042	5020
	3	0,021	7190
	3	0,0105	8530
	3	0,005	8530
	4	0,031	435
	5	0,016	129
0,2	1	0,036	343
	2	-	-

*) Blindwert der Fraktion "Weiß" (13,0 mg Protein/ml) abgezogen

**) u.d.B. = unter der Bestimmungsgrenze

***) Ohne Protein der Fraktion (1) (= 0,326 mg/Ansatz)

Tabelle 7: DOAP-Bildung mit den Unterfraktionen der Fraktion (1) nach Adsorptionschromatographie an Aluminiumgel (vgl. S. 10)*)

(Eluat + 0,1 ml der Fraktion (4); 0,1 ml Fraktion (4) (ohne Eluat) = 50 /uMol DOAP/g Protein/Stunde)

Elution mit M $PO_4^{=}$	Eluat-Nr. (je 10 ml)	mg Protein der Unterfraktion (Eluat)/Ansatz	/uMol DOAP/ g Protein der Unterfraktion**)/ Stunde
0,005	1	-	-
0,02	1	-	-
0,08	1	0,153	218
	2	0,132	210
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-
0,2	1	-	-
	2	0,081	1840
	3	0,062	2050
	4	0,094	1710
	5	0,057	1120

*) Blindwert der Fraktion "Weiß" (13,0 mg Protein/ml) abgezogen

**) Ohne Protein der Fraktion (4) (= 0,085 mg/Ansatz)

Tabelle 8: Anreicherung der in den Fraktionen (1) und (4) enthaltenen Faktoren durch Chromatographie an Aluminiumgel*)

Fraktion	mg Protein der Fraktion (1) bzw. (4) oder Unterfraktion (1) bzw. (4)/Ansatz	/uMol DOAP/ g Protein (Fraktion bzw. Unterfraktion)/ Stunde	Anreicherung
(1)**)	0,326	590	
(1)**)	0,062	2050	3,5-fach
(4)***)	0,085	1370	
(4)***)	0,005	8530	6-fach

*) Blindwert der Fraktion "Weiß" (12,1 mg Protein/Ansatz) abgezogen

**) Fraktion (4): 0,085 mg Protein/Ansatz

***) Fraktion (1): 0,326 mg Protein/Ansatz

reicherung der aktiven Proteine auf das 4- bis 6-fache erzielt werden (Tabelle 6 - 8 (S. 26 - 28)). Um die Anreicherung deutlich werden zu lassen, wurde die jeweilige DOAP-Bildung nur auf den Proteingehalt der Fraktion bezogen, in der sich das anzureichernde Prinzip befand. Die Fraktionen 1 und 4 dürften nach der Gelbehandlung so weit gereinigt sein, daß eine Auftrennung mit Hilfe der präparativen Diskelektrophorese aussichtsreich erscheint.

IV. D I S K U S S I O N

Aus den hier niedergelegten experimentellen Ergebnissen lassen sich insbesondere zwei neue Gesichtspunkte entnehmen:

Erstens konnte gezeigt werden, daß die Enzyme, die das offensichtlich an die Fraktion "Weiß" gebundene Substrat zu DOAP umsetzen, nicht nur in der Fraktion "Gelb", sondern auch im Cytoplasma anzutreffen sind. Die Verteilung der Enzymaktivität zwischen dem Matrixraum der Mitochondrien (Fraktion "Gelb") und dem Cytoplasma (vgl. Tabelle 1, S. 18) erinnert an die bei der Ratte gefundene Verteilung der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, von der 10 % in den Mitochondrien und 90 % im Cytoplasma registriert werden konnten (9). Diese Übereinstimmung mit der Verteilung eines wichtigen Gluconeogenese-Enzyms spricht - neben den schon erwähnten Phänomenen (1) - für die Beteiligung der hier zur Diskussion stehenden 3-Phospho-D-glyceratreduktase an der Gluconeogenese.

Zum zweiten konnte gezeigt werden, daß mindestens zwei Faktoren - sehr wahrscheinlich zwei verschiedene Enzyme - an der Umwandlung des bisher noch nicht charakterisierten Substrates beteiligt sind. Diese Faktoren konnten durch die Chromatographie an DEAE-Cellulose eindeutig getrennt werden. Unklar bleibt bisher,

welche Reaktionen den einzelnen Enzymen zuzuordnen sind. Nach SCHOLE (1) läßt sich 3-Phosphoglyceryl-N-Acetyl-Cysteamin - also aktives 3-PG - als Substrat für die DOAP-Bildung verwenden. Andererseits ist es bisher nicht gelungen, 3-PG an der Fraktion "Weiß" nachzuweisen, obgleich sich das 3-PG relativ leicht in alkalischem Milieu ohne Hydrolyse des Phosphatesters abspalten lassen müßte, wenn es in Thioesterbindung (1) an das Enzymprotein gebunden ist. Demnach scheint das 3-PG maskiert vorzuliegen und erst mit Hilfe der hier getrennten Faktoren 1 und (oder) 4 in 3-PG und anschließend in DOAP überführt zu werden. Die weitere Bearbeitung dieses Themas wird sich in erster Linie mit dieser Frage zu beschäftigen haben.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde versucht, mit Hilfe bekannter Proteintrennungsmethoden festzustellen, ob für die in Rattenlebermitochondrien nachgewiesene Bildung von Dihydroxyacetonphosphat (DOAP), für die neben einer mitochondrialen Membranfraktion ("Weiß") das lösliche Enzymmaterial des mitochondrialen Matrixraumes (Fraktion "Gelb") benötigt wird, eine oder mehrere lösliche Komponenten der "gelben Fraktion" erforderlich sind. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. Die in der Fraktion "Gelb" vorkommenden, zur DOAP-Bildung notwendigen Enzymproteine sind ebenfalls im Cytoplasma enthalten. Die Relation der gemessenen Aktivitäten kann annähernd mit 1 (Fraktion "Gelb") zu 9 (Cytoplasma) angegeben werden.

2. Durch Ammoniumsulfatfraktionierung und anschließende Chromatographie an DEAE-Cellulose konnten aus dem Cytoplasma zwei Komponenten, sehr wahrscheinlich zwei verschiedene Enzyme, abgetrennt werden, die beide für die DOAP-Bildung mit der Fraktion "Weiß" erforderlich sind. Beide Faktoren lassen sich durch 30- 60 %ige Sättigung mit Ammoniumsulfat aus dem Cytoplasma aussalzen. Bei der Chromatographie an DEAE-Cellu-

lose erscheint die erste Fraktion im Durchlauf (0,005 M $PO_4^{'''}$) und die zweite Fraktion in dem mit 0,2 M $PO_4^{'''}$ erhaltenen Eluat. Eine weitere Reinigung bzw. Anreicherung beider Faktoren gelingt durch Chromatographie an Aluminiumgel. Die in der Fraktion 4 enthaltene Komponente läßt sich mit einer $PO_4^{'''}$-Konzentration von 0,08 M, das in der Fraktion 1 vorkommende aktive Protein mit einer $PO_4^{'''}$-Konzentration von 0,2 M vom Gel eluieren. Die hierdurch erzielte zusätzliche Anreicherung ist 3,5- bzw. 6-fach.

S U M M A R Y

This investigation uses known protein separating methods to study dihydroxyacetone phosphate (DOAP) detected in mitochondria in rat liver. For DOAP formation it is necessary to have not only a mitochondrial membrane fraction ("white"), but also the soluble enzyme fraction of the mitochondrial matrix ("yellow"). It is attempted here to determine whether one or more soluble components of the "yellow" fraction are required for DOAP formation. The following results were obtained:

1. The enzyme proteins present in the "yellow" fraction that are required for DOAP formation are also contained in the cytoplasm. The ratio of the measured activities can be given approximately as 1 ("yellow" fraction) to 9 (cytoplasm).

2. By means of ammonium sulphate fractionation and then chromatographic separation using DEAE cellulose it was possible to separate from the cytoplasm two components, most probably two different enzymes, which are both needed together with the "white" fraction for DOAP formation. The two factors can be salted out of the cytoplasm by 30 - 60 % saturation with ammonium sulphate. After chromatographic separation using DEAE cellulose the first fraction appears in the elute obtained with a concentration of 0,005 M PO_4^{III} , and the other fraction in the elute obtained with 0,2 M PO_4^{III} . Further purification or enrichment of the two factors is achieved by chromatographic separation using aluminium gel.

The component contained in fraction 4 can be elutriated with a PO_4^{III} concentration of 0,08 M, and the active protein present in fraction 1 with a PO_4^{III} concentration of 0,2 M of gel. This yields additional enrichment of 3,5 and 6 respectively.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) J. SCHOLE: Herbsttagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, Münster 1968

(2) H. KATZELMEIER: Diplomarbeit Technische Hochschule München 1958

(3) R. WILKE: Dissertation (med. vet.) München 1969

(4) P. SCHAMBYE, H.G. WOOD, G. POPJAK: J. Biol. Chem. 206, 875 (1954)

(5) P.D. RAY, D.O. FORSTER, H.A. LARDY: J. Biol. Chem., 241, 3904 (1966)

(6) E. SCHWEIZER, D. OSTERHELD, W. CHAN, Ch. DUBA, F. LYNEN: 16. Kolloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie, Mosbach, April 1965

(7) G. BEISENHERZ, H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOCK, K.H. GARBACH, E. MEYER-ARENDT, G. PFLEIDERER: Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)

(8) S.P.COLOWICK, N.O. KAPLAN: Methods in Enzymology, Volumen I, S. 97 - 98, Academic Press, New York 1955

(9) F. J. BALLARD, R.W. HANSON: Biochem. J., 104, 866 (1967)

Nach Beendigung meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor DDr. DDr.h.c. Johannes BRÜGGEMANN für die Überlassung des Themas und die großzügig gewährten Arbeitsbedingungen in seinem Institut danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor DDr. Jürgen SCHOLE für seine stets gewährte freundliche Unterstützung und wissenschaftliche Beratung.

L E B E N S L A U F

Am 17. Juli 1947 wurde ich als Tochter des Notars Dr. Helmut Hahn und seiner Ehefrau Auguste, geb. Köhler, in Landshut geboren.

Von 1953 - 1957 besuchte ich die St. Martins-Volksschule in Landshut. 1957 trat ich in das Hans-Carossa-Gymnasium, Landshut, ein, wo ich im Juli 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1966 - 67 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit dem Studium der Veterinärmedizin und bestand dort im Sommer 1971 nach dreimonatiger Praktikantenzeit bei Dr. D. Breuer in Feldkirchen das Staatsexamen. Am 1. Oktober 1971 heiratete ich den Tierarzt Dr. Horst Bonengel.

Am 30. November 1971 erhielt ich meine Bestallung als Tierärztin.